

日本産海藻の生物活性：IL-6活性阻害作用

著者	柴田 潔，小宮山 寛機，林 正彦，平久 治，長谷川 和清，田中 次郎
雑誌名	日本歯科大学紀要．一般教育系
巻	37
ページ	39-42
発行年	2008-03-20
URL	http://doi.org/10.14983/00000639



日本産海藻の生物活性；IL-6 活性阻害作用
Bioactivity of Japanese Seaweeds, Inhibition of IL-6 Activity

日本歯科大学東京短期大学

柴 田 潔

北里研究所 基礎研究所
基礎医学検査センター

小宮山 寛 機

北里研究所 基礎研究所
実験動物管理センター

林 正 彦
平 久 治

東京海洋大学

長谷川 和 清
田 中 次 郎

Kiyoshi SHIBATA

Department of Dental Hygiene, The Nippon Dental University College at Tokyo
Fujimi 2-3-16, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0071, JAPAN

Kanki KOMIYAMA

Basic Medical Center, Center for Basic Research, The Kitasato Institute,
Shirokane 5-9-1, Minato-ku, Tokyo 108-8602, JAPAN

Masahiko HAYASHI, and Osamu HIRAKU

Laboratory Animal Center, Center for Basic Research, The Kitasato Institute,
Shirokane 5-9-1, Minato-ku, Tokyo 108-8602, JAPAN

Kazukiyo HASEGAWA, and Jiro TANAKA

Graduate School of Marine Science and Technology,
Tokyo University of Marine Science and Technology,
Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, JAPAN

(2007 年 11 月 30 日 受理)

The Extract from Seaweeds (*Dilophus okamurae* Dawson) showed selective growth inhibition against IL-6 dependent human myeloma cells (MH60). This extract did not inhibit the growth of cell lines which are not IL-6 dependent and the growth inhibition of the MH60 cell line was reversed by addition of excess IL-6 to the culture media.

Keywords: Seaweed; inhibitor; IL-6; interleukin -6

生体防御機構の恒常性維持に必須の IL-1 (Interleukin-1) や TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α : 腫瘍壊死因子) などのサイトカイン分子は、さまざまな炎症性疾患の病態に深く関わっていることが明らかされるようになり、炎症性サイトカインと呼ばれている。¹⁾

たとえば、関節リウマチ (RA : rheumatoid arthritis) の関節炎が起こる最初のステップでは、血液内に存在するリンパ球や好中球などの白血球が、血管内皮細胞との接着を介し、関節へ移行することからはじまる。この過程には、白血球と血管内皮細胞の接着に関わる分子や各種ケモカイン、炎症性サイトカイン

ンなどさまざまな分子が関与する。一方、関節局所では、TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が異常に高まり、それらはリンパ球浸潤、滑膜増殖、破骨細胞による軟骨組織破壊といった関節の病変形成に深く関わっていることが明らかにされた。²⁻⁴⁾ このように、制御機構から外れて産生された炎症性サイトカインは、RA 炎症病態のさまざまな過程で重要な役割を演じていること、また、さまざまな疾患の病態に関わる免疫調節分子としてのサイトカイン、さらにその受容体が明らかになってきたことから、サイトカインと特異的に結合し、その機能を阻害するモノクローナル抗体、さらにサイトカインの働きを阻害する受容体や拮抗物（アンタゴニスト）が検討されるようになってきた。

ここで、IL-6 がある種のガン細胞の成長の調節に関与する多機能サイトカインであることが明らかになり⁵⁾、当グループにおいて IL-6 要求性変異株を用いるスクリーニングにより、放線菌第二次代謝産物として IL-6 活性の特異的インヒビター Madindolin⁶⁾ を見いだした。

本研究では、調査対象を海藻に含有される化合物として、同様のスクリーニングを行った結果、IL-6 活性を阻害する成分を有する海藻が見いだされたのでここに報告する。

材料と方法

1) 海藻の採取

本研究に用いた海藻類は、Table 1 に示したように、茨城県ひたちなか市平磯、千葉県館山市坂田、神奈川県横浜市金沢区野島公園、横須賀市天神島、静岡県下田市白浜、田牛、新潟県柏崎市鯨波、沖縄県奥武島、西表島、南大東島、山梨県河口湖の各地より採取し、淡水・気生藻を含んでいる。また、全ての海藻は潮間帯で採取した後、すみやかに -25℃ において凍結保存したものをを用いた。

2) 評価試料の調整

採取地において凍結した海藻試料を解凍し、水洗によって付着物を除いた後、表面の水分を除いた葉片 50 g を秤量した。これに蒸留水を 200 ml 加えてミキサーで粉碎し、さらに 10 分間超音波粉碎を行い海藻懸濁水を得た。次いで、これにクロロホルムを等量加えて 1 時間スターラーで攪拌した後、セライトを補助剤として用いた濾過によって固形物を除いた。通過液を分液漏斗に移して水相を分離後、クロロホルム分画を無水硫酸ナトリウムにて脱水し、減圧下乾固し評価試料とした。なお、前報においてクロロフィル類の抽出量を制限することが明らかになっていることから、活性物質の分離操作を考慮して溶媒としてクロロホルムを用いた⁷⁾。

一方、水相部分については、減圧下濃縮乾固しこちらも評価試料とした。

試料の評価方法

細胞増殖の作用判定に用いた人骨髄腫細胞 (human myeloma cell: HM60) 及び同細胞の IL-6 非要求性変異細胞の継体培養には、Eagle's 最小発育培養液 (MEM)、10% 牛胎児血清 (FCS) を添加した MEM または、同様に 10% 牛胎児血清 (FCS) を添加した RPMI 1640 培養液を用いた。海藻抽出物の殺細胞作用を判定するために、それぞれの細胞を 200 μ l の培養液に加えた後、96-well の培養プレート (Corning) に移し CO₂ 通気下、37℃ にて 24 時間培養を行った。その後、それぞれの well に各段階濃度の海藻試料を含む溶液 5 μ l を加えた。72 時間培養後、テトラゾリウム塩法 (MTT) を用いて比色定量により細胞の成長を確認した。細胞増殖作用の判定に用いる細胞は、recombinant human IL-6 (rhIL-6) を完全に取り除く必要があるため、細胞を 2 回 RPMI 1640 培養液にて洗浄した。次いで、96-well の培養プレートを用い、1 well 当たり洗浄した細胞 (5 \times 10³ cells) を、10% 牛胎児血清 (FCS) を添加した RPMI 1640 培養液 100 μ l に懸濁した。次に、測定試料 5 μ l を加えた後、0.02U rhIL-6 (100 μ l) を添加して 5%CO₂-95%air 通

Table 1. List of the tested seaweeds and seagrass

和名	学名	採取地	採取年月日
カギイバラノリ	<i>Hypnea japonica</i> Tanaka	静岡県下田市白浜海岸 9	1988/6/16
ヘライワズタ	<i>Caulerpa brachypus</i> Harvey	千葉県館山市坂田 34.86992622	2001/5/25
フクリンアミジ	<i>Dilophus okamurai</i> Dawson	神奈川県横須賀市天神島 173	1999/12/15
アミジグサ	<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) Lamouroux	静岡県下田市白浜海岸 162	2000/4/5
タマイタダキ	<i>Delisea japonica</i> Okamura	静岡県下田市田牛 52	2000/4/5
ミル	<i>Codium fragile</i> (Suringar) Hariot	静岡県下田市白浜海岸 28.73674884	2000/6/17
スギノリ	<i>Chondracanthus tenellus</i> (Harvey) Hommersand	神奈川県横須賀市天神島 1.310624639	1999/12/15

Table 2. Effect of organic extracts from seaweed on the growth of IL-6 dependent and IL-6 independent human myeloma cell

Sample ($\mu\text{g/ml}$)	カギイバラノリ	ヘライワズタ	フクリンアミジ	アミジグサ	タマイタダキ	ミル	スギノリ
IL-6 dependent human myeloma cell							
1000.0	35.9	61.4	10.0	4.1	81.3	4.4	4.8
250.0	93.1	86.9	22.3	91.2	78.6	61.0	48.8
62.6	78.8	84.6	70.0	76.6	83.0	92.1	91.0
15.6	89.4	88.3	83.2	83.2	83.7	83.7	89.4
3.9	91.8	100.9	90.0	88.6	86.1	87.4	93.4
1.0	97.6	94.5	87.2	88.7	91.6	88.6	96.5
IL-6 independent human myeloma cell							
1000.0	98.0	91.8	83.5	88.6	93.3	78.9	92.9
250.0	98.8	100.4	79.5	95.5	88.9	81.2	95.0
62.6	98.0	92.8	91.2	93.6	96.7	84.3	90.9
15.6	100.5	97.2	98.3	93.4	92.2	96.9	98.0
3.9	103.2	94.5	95.3	94.1	92.7	88.0	94.5
1.0	101.7	98.3	101.1	100.8	97.9	91.9	96.5

*Growth of IL-6 dependent human myeloma cell in the presence of rhIL-6 is the control of all and growth percents of the test samples were calculated.

Table 3. Effect of aquar extracts from seaweed on the growth of IL-6 dependent and IL-6 independent human myeloma cell

Sample ($\mu\text{g/ml}$)	カギイバラノリ	ヘライワズタ	フクリンアミジ	アミジグサ	タマイタダキ	ミル	スギノリ
IL-6 dependent human myeloma cell							
1000.0	95.0	99.5	93.8	94.9	74.9	110.7	102.1
250.0	96.9	96.1	99.2	88.7	90.4	95.0	90.5
62.6	90.2	86.7	99.5	89.7	91.7	91.0	88.7
15.6	95.0	99.5	93.8	94.9	74.9	110.7	102.1
3.9	96.9	96.1	99.2	88.7	90.4	95.0	90.5
1.0	90.2	86.7	99.5	89.7	91.7	91.0	88.7
IL-6 independent human myeloma cell							
1000.0	99.6	100.2	96.4	97.5	98.6	98.1	98.9
250.0	103.0	100.3	99.2	97.8	95.6	96.3	101.4
62.6	99.3	100.2	96.4	94.2	94.8	89.0	98.7
15.6	101.1	97.9	101.7	99.2	91.0	94.6	98.1
3.9	97.3	95.6	95.6	94.5	92.2	101.1	95.1
1.0	99.7	99.2	103.7	98.8	101.3	97.5	99.3

*Growth of IL-6 dependent human myeloma cell in the presence of rhIL-6 is the control of all and growth percents of the test samples were calculated.

気下 37℃にて 72 時間培養を行った。細胞の増殖は、上記に示したテトラゾリウム塩法 (MTT) を用いて比色定量により求めた。一方、HM60 細胞の IL-6 非要求性変異株は、IL-6 の濃度を徐々に低下させることにより確立させたものである。HM60 細胞の IL-6 非要求性変異株の培養液中の生育は、IL-6 を添加しない場合であっても、通常の HM60 細胞の生育と同様であり、この場合も上記テトラゾリウム塩法 (MTT) を用いて比色定量により増殖を判定した。

結果と考察

人骨髄腫細胞 (human myeloma cell : HM60) の IL-6 要求性変異細胞に対し、recombinant human IL-6 (rhIL-6) を添加した場合と無添加の場合の細胞増殖率を各種海藻有機相粗抽出物質及び水相粗抽出物質それぞれについて測定し、Table 2. および Table 3. に示した。また、それぞれの Table には、IL-6 要求性変異細胞に対し、recombinant human IL-6 (rhIL-6) を添加し

た場合の増殖率を100%として、各種海藻抽出物質を添加した場合の細胞増殖率を示している。また、IL-6 要求性変異細胞において、rhIL-6 無添加の場合の細胞増殖率は、20.5%であった。

IL-6 非要求性細胞に対する活性を細胞毒性の指標として見てみると、有機相抽出物質を添加したものについて最大濃度1000 μ g/ml においてフクリンアミジ、アミジグサおよびミルにわずかな細胞増殖阻害が見られるが、有機相、水相いずれの抽出物質について高い細胞毒性を示すものは無かった。一方、IL-6 要求性変異細胞の細胞増殖率を見てみると、カギイバラノリ、フクリンアミジ、アミジグサ、ミルおよびスギノリの各有機相抽出物質を添加した試料で1000 μ g/ml において、高い細胞阻害活性が見られた。カギイバラノリおよびアミジグサについては、この濃度段階にのみ顕著な活性を示している。一方、フクリンアミジ、ミルおよびスギノリの各試料について見てみると、1000 μ g/ml については、ミルおよびスギノリの有機相粗抽出物質を添加した各試料がそれぞれ4.4 μ g/ml、4.8 μ g/ml と高い細胞増殖抑制効果を示した。しかしながら、各段階での有機相粗抽出物質添加濃度を比較するとフクリンアミジにおいて、濃度依存的に活性の低下が見られまた、希釈した後、15.6 μ g/ml まで活性が保持されることから、本海藻中には添加した rhIL-6 の効果を濃度依存的に阻害する物質の存在が示唆される。また、IL-6 レセプターと相互作用しその効果を阻害していることも考えられる。

関節リウマチ (RA) の治療について見てみると、IL-6 などの炎症性サイトカインは特異的な受容体に認識され、作用を示すことから、サイトカインと受容体の結合を阻害する拮抗物 (アンタゴニスト) によりサイトカインが本来の受容体に結合できなくなるのである。

このような分子標的を行うことにより、従来のように炎症反応を全般的に抑制する抗炎症薬による治療とは異なり、特定の炎症反応を抑制することが可能となる。実際 RA に対し、TNF- α を標的にした生物学的製剤を用いた抗サイトカイン療法は、すでに実用段階にある。また、この作用のほかに IL-6 は、免疫反応、急性期反応の制御及びある種のガンの成長の調節に関与する多機能サイトカインである。そのため、IL-6 の活性を阻害することはガン悪液質及び慢性難治性炎症疾患 (キャスルマン病、急性リウマチ及び AIDS) に有効であると考えられる。

今後、フクリンアミジを大量採取を行い、活性成分を単離するとともに物理化学的測定を行い活性物質の構造を明らかにしたい。

文献

- 1) Oppenheim, J. J.; C. O. C. Zacharise, N. Mukaida & K. Matsushima : Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu.Rev. Immunol.* 9 : 617-648, 1991
- 2) Kishimoto, T.; S. Akira & T. Taga : IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int. J. Immunopharmacol.* 14,431-438 1992
- 3) Hirano, T.: Interleukin 6 (IL-6) and its receptor: their role in plasma cell neoplasias. *Int. J. Cell Cloning* 9: 166-184, 1991
- 4) Hocke, G. M.; D. Barry & G. H. Fey: Synergistic action of interleukin-6 response element of the rat alpha 2 macroglobulin gene. *Mol. Cell Biol.* 12: 2282-2294, 1992
- 5) Zhang, X. G.; R. Bataile, M. Jourdan, S. Saeland, J. Banchereau, P. Mannoni & B. Klein: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. *Blood* 76: 2599-2605, 1990
- 6) Hayashi, M.; Y. Kim, S. Takamatsu, A. Enomoto, M. Shinose, Y. Takahashi, H. Tanaka, K. Komiyama & S. Omura: Modindoline, a novel Inhibitor of IL-6 activity from *Streptomyces* sp. K93-0711. *J. Antibiotics* 49, 1091-1095, 1996
- 7) 柴田潔, 田中次郎, 薩摩林貞美: 海藻由来の生理活性物質の探索 I. 分離精製法および抗菌活性, 日本歯科大学紀要 29: 117-124, 2000